©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

Vitalfärbung von Diatomeen mit basischen Farbstoffen

Von Ilse Hirn
(Aus dem Pflanzenphysiologischen Institut der Universität Wien)

Mit 8 Textabbildungen

(Vorgelegt in der Sitzung am 12. März 1953)

Einleitung.

Mit der Vitalfärbung verschiedener Süßwasserdiatomeen hat sich vor allem Cholnoky 1934/35 befaßt. Er ist der erste, der bei der Färbung der Kieselalgen den Anforderungen entspricht, welche die moderne Zellphysiologie an die Vitalfärbung stellt. Während frühere Autoren sich mit einer — meist recht ungenauen — Beschreibung des endgültigen Färbebilds begnügen, verwendet Cholnoky die Vitalfärbemethode als Hilfsmittel zur Klärung von Fragen der Stoffaufnahme und Stoffspeicherung. Er konnte an *Melosira* (1934) und verschiedenen pennaten Diatomeen (1935) sowie später an *Spirogyra* und *Mougeotia* (1937) zeigen, daß bei Einwirkung von basischen Farbstoffen nicht nur der Zellsaft, sondern auch andere Teile der Zelle den Farbstoff speichern. Dabei werden durch die Bindung des Farbstoffs dem Protoplasma oft lebenswichtige Bestandteile entzogen, so daß die Färbung irreversibel wird und dadurch früher oder später zum Absterben der Zelle führen muß. Cholnoky tritt hier entschieden der alten Auffassung Lauterborns entgegen, der eine Färbung mit Methylenblau noch als unschädlich und umkehrbar bezeichnet.

Ältere Beobachtungen an gefärbten Diatomeen beschäftigen sich kaum mit diesen Fragen, sondern beziehen sich in erster Linie auf die Darstellung des Volutins, das ja bei der Speicherung von Farbstoffen in der Diatomeenzelle eine hervorragende Rolle spielt. Es ist schwer zu entscheiden, wieweit das Volutin verschiedenen anderen, von einer Anzahl von Autoren beschriebenen Inhaltsstoffen gleichzustellen ist. Sehr ähnlich sind wohl die von Babes 1887/1889/1895 bei Bakterien gefundenen metachromatischen Körperchen sowie die von Bütschli 1890/1896 beschriebenen „roten Körnchen" der Bakterien und Cyanophyceen. Bei Diatomeen wurden derartige Einschlüsse erstmalig 1896 von Lauterborn als Bütschlische Körnchen beschrieben. Der Ausdruck „Volutin" wurde erst 1903 von A. Meyer für die Inhaltskörperchen von *Spirillum volutans*

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

geprägt, die in ihrem chemischen Verhalten den Babesschen und Bütschlischen Körnchen sehr ähnlich sind.

Auch in der französischen Schule wurden von P. A. Dangeard und Guilliermond an verschiedenen Objekten, vor allem an Hefen, ähnliche Inhaltsstoffe beobachtet, die sich mit basischen Anilinfarben lebhaft anfärben. P. A. Dangeard bezeichnet 1916 als Metachromatin eine Substanz, die in vielen Zellen gelöst vorkommt und Diffusfärbung des Zellsaftes verursacht. Die von ihm als „metachromes" bezeichneten Fällungsprodukte solcher Zellsäfte sind wohl den „Entmischungserscheinungen" deutscher Autoren zu vergleichen. Diese mehrdeutige Anwendung des Ausdrucks „Metachromatin" durch Guilliermond und Dangeard gab in den folgenden Jahren Anlaß zu heftigen Diskussionen (vgl. die zusammenfassenden Darstellungen von Guilliermond 1930, S. 137, und P. Dangeard 1947, S. 443 und 449).

In jüngster Zeit haben Cholnoky und Höfler (1950, S. 170, Abb. 20) bei ihren Untersuchungen an Hochmooralgen auch Diatomeen vital gefärbt und vor allem die Färbungsvorgänge an *Pinnularia* beschrieben. 1951 haben Höfler und Schindler Diatomeen in cH-gestuften Farbbadreihen untersucht und gezeigt, daß die Färbeschwellen für Kieselalgen auffallend tief liegen. Sie vermuten, daß diese Erscheinung verursacht wird durch eine besondere Affinität der Speicherstoffe der Diatomeen zu den wenigen in sauren p_H-Stufen noch vorhandenen Farbmolekülen. Die Versuche von Höfler und Schindler waren während eines Aufenthalts in der Ramsau durchgeführt worden; nachträglich stellte sich jedoch heraus, daß bei der Herstellung der Puffer Fehlerquellen durch den unterschiedlichen Kristallwassergehalt der verwendeten Phosphate entstanden waren. Ich habe nun mit exakten Mitteln im Laboratorium in Wien zuerst die Versuche an Desmidiaceen wiederholt und weitergeführt (vgl. Hirn 1953); über die Ergebnisse meiner cH-gestuften Versuchsreihen an Diatomeen soll im ersten Abschnitt dieser Arbeit berichtet werden.

Das Hauptproblem der vorliegenden Arbeit ist aber wohl die Frage nach der Aufnahme des elektroadsorptiv an die Membran gebundenen Farbstoffs ins Zellinnere, da doch Ionen nicht durch den Protoplasten permeieren können. Nicht die physikalisch-chemische Lösung wird im folgenden gesucht, wohl aber soll, anschließend an meine Befunde an Desmidiaceen, die Tatsache dieser nachträglichen Farbstoffaufnahme neu erhärtet und besser experimentell erfaßt werden.

Schließlich möchte ich im letzten Abschnitt der Arbeit von meinen Vitalfärbungsversuchen mit einer Anzahl von basischen Farbstoffen berichten, die vor allem die ungleiche Resistenz verschiedener Diatomeenarten belegen und damit einen Beitrag zur vergleichenden Speziesphysiologie auch innerhalb der Diatomeen liefern sollen.

Es sei mir gestattet, meinem verehrten Lehrer, Herrn Prof. Dr. K. Höfler, der mich mit der Untersuchung dieses Gegenstandes betraute und meine Arbeit mit ständiger Anteilnahme verfolgte, meinen aufrichtigen Dank auszusprechen.

Material und Methodik.

Für meine Untersuchungen an Diatomeen verwendete ich immer möglichst frisches Material, das an verschiedenen Fundorten in der Umgebung von Wien gesammelt wurde. Besonders reiche und schöne Diatomeenproben fand ich während der optimalen Vegetationsperioden im Frühjahr und Herbst fast wöchentlich an zwei Standorten in Gaaden bei Mödling, 23 km von Wien. Da beide Fundorte, die sehr reich auch an weniger häufigen Arten sind, von Wien aus leicht erreicht werden können, möchte ich sie hier kurz beschreiben und eine Liste der dort gefundenen Arten wiedergeben. Für die Bestimmung meines Gaadener Materials bin ich Herrn Dr. B. v. Cholnoky (Pretoria) zu größtem Dank verpflichtet.

Standort A liegt, ungefähr in der Ortsmitte, links neben der von Mödling nach Heiligenkreuz führenden Straße. Es ist dies ein kleiner Tümpel, der den letzten Rest eines aufgelassenen Mühlenteiches darstellt. Das Gewässer besitzt einen kleinen Abfluß und wird ständig durch das reichlich vorhandene Grundwasser gespeist.

Standort B ist von dem oben beschriebenen Standort nur wenige Minuten entfernt. Es ist ein kleiner, fast stagnierender Wasserlauf, der in den Mödlingbach an dessen linkem Ufer einmündet. Knapp vor der Mündung erweitert sich dieses kleine Gerinne bis zu einer Breite von etwa $1^1/_2$ m, die Tiefe beträgt bei Normalwasserstand 5—10 cm. Eine größere offene Wasserfläche ist nur an wenigen Stellen vorhanden, da das Rinnsal im Sommer vom Ufer her stark verwachsen wird.

Artenliste.

1. Achnanthes minutissima Kg. — A, B
2. Achnanthes lanceolata Breb. — B
3. Amphora ovalis Kg. — B
4. Amphora ovalis Kg. var. pediculus Kg. — A, B
5. Amphora perpusilla Grun. — B
6. Caloneis bacillum (Grun.) Mereschk. — A, B
7. Caloneis silicula (E.) Cl. — A, B
8. Cocconeis placentula E. — B
9. Cymatopleura solea (Breb.) W. Sm. — A, B
10. Cymbella aspera (E.) Cl. — A, B
11. Cymbella naviculiformis Auersw. — B
12. Denticula tenuis Kg. — B
13. Diploneis ovalis (Hilse) Cl. — A
14. Fragilaria capucina Desm. — B
15. Frustulia vulgaris Thw. — B
17. Gomphonema acuminatum E. — B
18. Gomphonema angustatum (Kg.) Rabh. — B
19. Gomphonema intricatum Kg. var. dichotoma (Kg.) Grun. — A
20. Gomphonema parvulum (Kg.) Grun. — A
21. Gyrosigma acuminatum (Kg.) Rabh. — B
22. Gyrosigma attenuatum (Kg.) Rabh. — B

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

23. Melosira varians Ag. — B
24. Meridion circulare Ag. — B
25. Navicula binodis E. — B
26. Navicula cryptocephala Kg. — A, B
27. Navicula cuspidata Kg. var. ambigua (E.) Cl. — B
28. Navicula dicephala (E.) W. Sm. — B
29. Navicula gracilis E. — B
30. Navicula lanceolata (Ag.) Kg. — A, B
31. Navicula oblonga Kg. — B
32. Navicula placentula (E.) Grun. var. rostrata Mayer — B
33. Navicula pupula Kg. — B
34. Navicula radiosa Kg. — B
35. Navicula rhynchocephala Kg. — B
36. Navicula rostellata Kg. — A
37. Navicula viridula Kg. — B
38. Neidium affine (E.) Cl. var. amphirrhynchus Cl. — A, B
39. Neidium affine (E.) Cl. fo. hercyna (Mayer) Hust. — A
40. Neidium iridis (E.) Cl. — A, B
41. Neidium productum (W. Sm.) Cl. — A, B
42. Nitzschia acuta Hantsch — B
43. Nitzschia amphibia Grun. — B
44. Nitzschia angustata (W. Sm.) Grun. — B
45. Nitzschia fonticula Grun. — A
46. Nitzschia linearis W. Sm. — A, B
47. Nitzschia recta Hantzsch — B
48. Nitzschia sigmoidea (E.) W. Sm. — B
49. Pinnularia maior (Kg.) Cl. — A, B
50. Pinnularia microstauron (E.) Cl. var. Brébissonii — B
51. Pinnularia viridis (Nitzsch) E. — A, B
52. Stauroneis acuta W. Sm. — A
53. Stauroneis anceps E. — A, B
54. Stauroneis phoenicenteron E. — B
55. Stauroneis Smithii Grun. — A, B
56. Surirella angustata Kg. — B
57. Surirella elegans E. — B
58. Surirella ovata Kg. var. minuta Breb. — B
59. Synedra minuscula Grun. — B
60. Synedra parasitica W. Sm. — B
61. Synedra parasitica W. Sm. var. subconstricta Grun. — B
62. Synedra tenera W. Sm. — A
63. Synedra ulna (Nitzsch) E. — A, B

Methodisches: Von einem Tropfen der Algenprobe wurde sorgfältig Wasser abgesaugt, sodann die Farblösung zugesetzt und eine bestimmte Zeit einwirken gelassen. Schließlich wurde die jeweils entsprechende Pufferlösung oder dest. H_2O durchgesaugt. Wo Feinheiten des physiologischen Verhaltens untersucht werden sollten, wurde der Farbstoff unter dem Mikroskop zugesetzt und so der Verlauf der Färbung bei einzelnen Zellen in allen Stadien festgehalten.

I. Färbung verschiedener Arten in cH-gestuften Farbbadreihen.

Die Aufnahme von basischen Vitalfarbstoffen in die lebende pflanzliche Zelle ist weitgehend von den Dissoziationsverhältnissen

des Farbstoffs abhängig (vgl. Strugger 1936 f., Drawert 1940/1948/1951, Höfler 1947/1949). Über einem bestimmten, für die einzelnen Farbstoffe verschieden liegenden Umschlagspunkt herrschen lipoidlösliche, permeierfähige Farbmoleküle vor, die leicht ins Zellinnere eindringen können. Im darunterliegenden Bereich der p_H-Skala dagegen befindet sich der Farbstoff größtenteils in ionisierter Form und kann nur elektroadsorptiv von der Zellwand gebunden werden. Während aber die meisten Forscher einen raschen Übergang von der molekularen in die dissoziierte Phase des Farbstoffs annehmen, konnte Höfler 1947/1948/1949 nachweisen, daß in einem überraschend weiten Übergangsgebiet neben den Farbionen noch Farb(salz)moleküle vorhanden sind. Dieses langsame Ausklingen der molekularen Phase gegen den sauren Bereich zu ist von größter Bedeutung für die Möglichkeit einer Färbung des Zellinneren in stärker dissoziierten Lösungen. Dies geht aus den folgenden Untersuchungen deutlich hervor.

Als Farbstoff wurde wegen seines stark im Alkalischen gelegenen Umschlagsbereichs Toluidinblau verwendet. Orientierende Versuche mit Neutralrot und Brillantkresylblau zeigten, daß eine Grenzbestimmung für Diatomeen mit diesen Farbstoffen unmöglich ist, da sich die Diatomeenkörnchen bis in ganz saure, die Zellen bereits schädigende Stufen anfärben. Die verwendeten Pufferlösungen sowie die Arbeitsmethoden waren die gleichen wie für die Desmidiaceen. Die Farbstoffkonzentration war 1 10.000, die Färbezeit betrug 2 Minuten. Die in Tabelle 1, S. 576, angeführten Werte beziehen sich auf Beobachtung sofort nach der Färbung. Dies muß festgehalten werden, da bei den Diatomeen eine nachträgliche Aufnahme des Farbstoffs aus der Zellwand ins Zellinnere stattfindet. Im folgenden Kapitel wird diese Erscheinung an *Pinnularia viridis* noch ausführlich beschrieben werden.

Während die Färbegrenzen der früher von mir untersuchten Desmidiaceen durchwegs im Alkalischen liegen, sind sie bei den Diatomeen für die meisten Arten bei p_H 6,0 zu suchen, ja manche Cymbellen können auch noch bei p_H 4,8 vitale Inhaltsfärbung zeigen. Dies überrascht im ersten Augenblick, da ja in diesem p_H-Bereich auch bei Annahme eines weiten Umschlagsbereichs nur mehr eine minimale Anzahl von Molekülen vorhanden sein kann. Höfler-Schindler haben diese auffällig tiefe Färbegrenze an einigen in Mischproben vorkommenden Diatomeen erstmalig beobachtet. Sie nahmen für diese Diatomeenkörnchen eine besonders starke Affinität des Speicherstoffs zu den noch spärlich vorhandenen Farb(salz)molekülen an. Wäre ein Eindringen von Farbionen der Fall, so müßte auch in ganz sauren Bereichen, etwa

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

bei p_H 3,1, eine Anfärbung des Protoplasten stattfinden, da ja in diesem Bereich Ionen überreichlich vorhanden sind. Das Bestehen einer Färbegrenze jedoch zeigt, daß eine Permeation der Ionen durch das lebende Protoplasma nicht in Frage kommt (vgl. auch Pecksieder 1950).

Auffällig verhielt sich *Pinnularia viridis*, welche bei Kurzfärbung von 2 Minuten erst bei p_H 10,1 in größerem Ausmaß Inhaltsfärbung zeigte. Ab und zu färben sich allerdings schon bei p_H 8,0 einige Zellen an, es sind dies aber im Durchschnitt nur 6%, während bei p_H 10,1 die Färbbarkeit schon 40—50% beträgt. Läßt man die Farblösung längere Zeit einwirken, so wird der Grenzwert weitgehend herabgesetzt (vgl. Tabelle 2). Eine solche Abhängigkeit der Inhaltsspeicherung von der Färbedauer ist auch bei vielen anderen Diatomeen, vor allem bei Cymbellen, sehr häufig.

Tabelle 1.

Diatomeen, Färbeschwellen in cH-gestuften Toluidinblaureihen.

n/100 HCl	1	—	—	—	—	—	—	—
n/150 KH_2PO_4	9	10	9,5	7	5	4,5	4	3
n/150 Na_3PO_4	—	—	0,5	3	5	5,5	6	7
pH um	3,1	4,8	6,0	7,1	8,0	9,6	10,1	11
Melosira sp.	—	—	+	+				
Meridion circulare		—	+	+				
Fragilaria sp.	—	—	+	+				
Diatoma vulgare	—	—	+ —	+				
Tabellaria flocculosa	—	—	+	+				
Tabellaria fenestrata	—	—	+	+				
Stauroneis acuta		—	+	+				
Amphora ovalis		—	—	+	+			
Achnanthes minutissima		—	+	+	+			
Cymbella cistula	—	—	+	+				
Cymbella austriaca	—	+ —	+	+				
Cymbella sp.	—	+ —	+	+				
Synedra ulna	—	—	+	+				
Pinnularia viridis		—	—	—	—	—	+	+

Tabelle 2.

Pinnularia viridis, gefärbt mit cH-gestuften Toluidinblaulösungen 1 10.000.

Prozentsatz der gefärbten Zellen bei verschiedenen Färbezeiten.

Färbedauer	p_H 6,0	p_H 7,1	p_H 8,0	p_H 10,1	p_H 11
2 Min.	0	0	6	50	100
15 Min.	0	8	45	—	—
45 Min.	50	—	—	—	—

Das Färbebild der Diatomeen ist ziemlich einheitlich. Bei den meisten Arten werden im Zellsaft kleine violette Körnchen ausge-

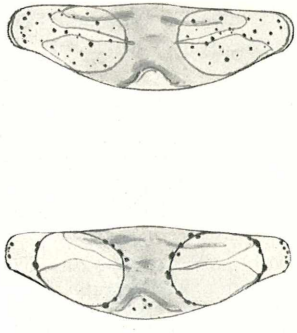

Abb. 1

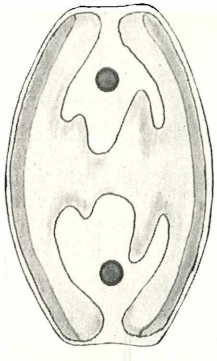

Abb. 2

Abb. 1. *Cymbella* sp., gefärbt mit Toluidinblau 1 : 10.000, p_H 10,1. Die violetten Entmischungskügelchen wandern aus dem Zellsaft ins Plasma, wo sie schließlich den stark kontrahierten Vakuolen aufsitzen.

Abb. 2. *Amphora ovalis*, gefärbt mit Toluidinblau 1 : 10.000, p_H 8,0. Die Volutinkugeln sind violett gefärbt, geschichteter Aufbau.

fällt, die sich in leichter BMB befinden. Bei vielen Zellen vergrößern sich diese Körnchen allmählich zu kleinen Entmischungströpfchen, die aus dem Zellsaftraum austreten können und dann die Tonoplasten säumen. Besonders schön konnte ich diesen Vorgang bei einer nicht näher bestimmten Spezies von *Cymbella* beobachten (Abb. 1). Auch im Cytoplasma selbst können kleine violette Körnchen entstehen. Solche Entmischungskörnchen wurden bei allen in Tab. 1 angeführten Arten und vielen anderen Diatomeen, wie bei *Neidium affine, Cymatopleura solea, C. elliptica, Gyrosigma acuminatum, G. attenuatum* und *Epithemia* sp., sowie bei verschiedenen Spezies von *Nitzschia, Navicula* und *Cymbella* beobachtet.

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

Geringer ist die Anzahl der Arten, die große färbbare Volutinkugeln besitzen. Solche wurden bei *Amphora ovalis* (Abb. 2), *Cymbella aspera, Diploneis ovalis, Cymbella prostrata, Navicula cuspidata, N. oblonga* und *Caloneis amphisbaena* beobachtet. In diesen Zellen mit färbbaren Volutinkugeln treten die kleinen violetten Diatomeenkörnchen häufig gar nicht oder nur in geringer Anzahl auf.

Diffuse violette Zellsaftfärbung begegnete mir bei den Diatomeen in allen untersuchten p_H-Stufen (p_H 6,0 bis um 12) verhältnismäßig selten, sie wurde öfter bei *Pinnularia viridis* und *Synedra ulna* sowie vereinzelt bei *Cymbella aspera, Amphora ovalis* und *Stauroneis acuta* gefunden.

Im folgenden möchte ich kurz die Färbebilder von *Diatoma vulgare* und *Navicula cuspidata* schildern, die einerseits für die Bildung von Entmischungströpfchen, anderseits für die Färbung der Volutinkugeln charakteristisch sind.

Diatoma vulgare (Abb. 3)

Hier verwendete ich Methylenblau 1:10.000, gelöst in dest. H_2O. Durch seitliches Zusetzen der Farblösung unter das Deckglas wurden verschieden abgestufte Färbungsbilder erreicht. Dort, wo die Zellen durch die beigemengten Cladophorafäden etwas gegen die zuströmende Farblösung abgeschirmt waren, konnte der Färbevorgang gut beobachtet werden. Schon nach kurzer Zeit bildeten sich im Zellinnern kleine blaue Körnchen und Tröpfchen, die sich in leichter BMB befanden und binnen 10 Minuten oft bis auf das Doppelte ihrer ursprünglichen Größe anwuchsen. Die Zellwand färbte sich immer erst nach Bildung dieser Tröpfchen. Mit der Inhaltsfärbung ist eine fortschreitende Vakuolenkontraktion verbunden. Die Entmischungskügelchen lagern sich allmählich an die Tonoplasten an, welche immer stärker konturiert hervortreten. In diesem Stadium sind die Zellen schon schwer geschädigt und nicht mehr plasmolysierbar. Nun zeigen auch die Chromatophoren bereits Anzeichen schwerer Schädigung, sie werden grünlich und formlos. Das letzte Stadium des Nekroseverlaufs ist das Absterben der Tonoplasten. 1—2 Minuten darauf sind alle blauen Tröpfchen aufgelöst, das Plasma ist nun diffus gefärbt. Daß es sich hier um Entmischungskugeln handelt, beweist wohl schon ihre Auflösung beim Zelltod.

Navicula cuspidata

Diese Art besitzt ähnlich wie *Amphora ovalis* in jeder Vakuole eine große Volutinkugel. In einzelnen Fällen kann diese Volutinkugel auch fehlen, in solchen Zellen sind besonders viele Fettkugeln an der Plasmabrücke zu beobachten. Bei Färbung mit Toluidinblau 1:10.000, gelöst in dest. H_2O, zeigt *Navicula cuspidata* deutliche Metachromasie: der Kern färbt sich himmelblau an, während die Volutinkugeln einen ausgesprochen rotvioletten Farbton annehmen. Außerdem bilden sich im Zellsaft kleine violette Körnchen, die sich in lebhafter BMB befinden. Die gefärbten Volutinkugeln lassen eine Schichtung erkennen, die an den Bau der Entmischungskugeln der Desmidiaceen erinnert. Von außen nach innen folgt auf einen dunklen Rand ein heller, stark lichtbrechender Kreis, das Innere

der Kugeln ist homogen rotviolett gefärbt. Oft bleiben diese Volutinkugeln auch ungefärbt, in diesem Fall sitzt ihnen meist eine Anzahl der kleinen, im Zellsaft entstandenen blauvioletten Körnchen auf (Abb. 4).

Bei dem von mir untersuchten Material überraschte die Tatsache, daß sich zuerst der Kern und später erst die Volutinkugeln anfärbten, was bei

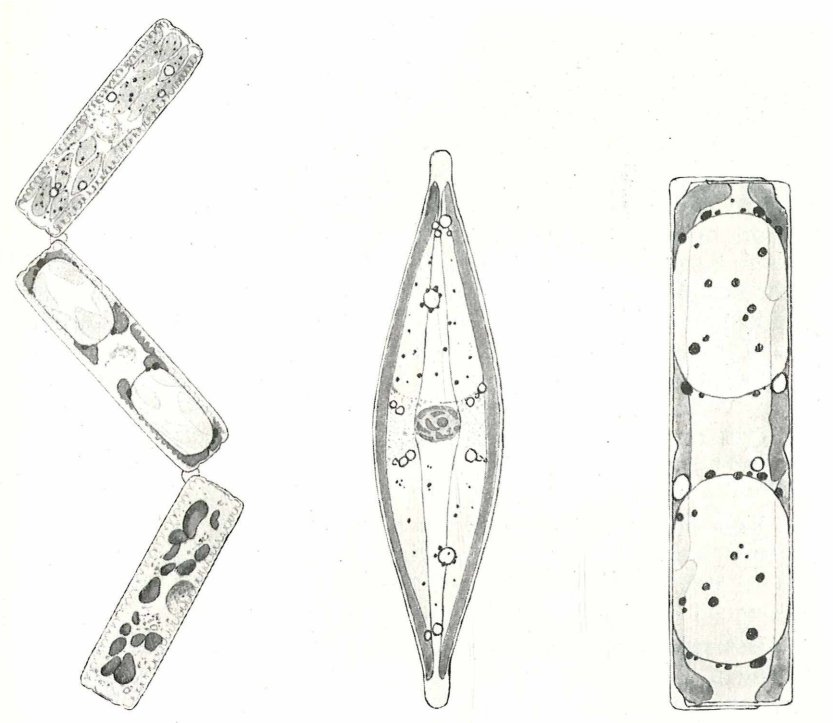

Abb. 3 Abb. 4 Abb. 5

Abb. 3. *Diatoma vulgare*, gefärbt mit Methylenblau 1 : 10.000 in dest. H_2O. Blaue Entmischungskügelchen sammeln sich an den Tonoplasten, Nekrose.

Abb. 4. *Navicula cuspidata*, gefärbt mit Toluidinblau 1 : 10.000, p_H 6,0. Volutinkugeln ungefärbt, Entmischungskörnchen im Zellsaft.

Abb. 5. *Pinnularia viridis*, gefärbt mit Toluidinblau p_H 10,1. Tonoplasten gesäumt von violetten Entmischungskugeln.

den anderen Diatomeen nie der Fall war. Dadurch sahen die Zellen von Anfang an recht geschädigt aus. Nach 10—15 Minuten begann auch der Chromatophor sich nekrotisch zu verändern, die Zellen starben nun rasch ab. *Navicula cuspidata* ist somit eine der gegen Vitalfärbung am wenigsten resistenten Diatomeen.

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

II. Nachträgliche Aufnahme des Farbstoffs aus der Zellwand ins Zellinnere.

(Versuche an *Pinnularia viridis*.)

Eine nachträgliche Aufnahme des Farbstoffs aus der Zellwand ins Zellinnere wurde bereits von Czaja (1937, S. 92) beobachtet und ausführlich beschrieben. Czaja zeigte, daß aus einer Toluidinblaulösung in dest. H_2O, in der ja der Farbstoff in dissoziierter Form vorliegt, die Farbkationen fast vollkommen von der Zellwand adsorbiert werden können. Die Farbkationen werden elektrostatisch an die Membran gebunden, es tritt dabei eine violette Zellwandfärbung ein. Aus der Zellwand geht der Farbstoff alsbald ins Cytoplasma über, wo er bei *Spirogyra* in Form von blauen Körnchen gespeichert wird. Es kann also nach Czaja unter bestimmten Voraussetzungen auch in einer nicht molekularen Farblösung eine Anfärbung des Zellinnern stattfinden, allerdings nur über den Umweg einer vorherigen Anlagerung der Farbionen an die Zellwand. Wird die Membranfärbung durch Zusatz von $CaCl_2$ verhindert, so unterbleibt in solchen dissoziierten Farblösungen auch die Inhaltsfärbung. Liegt der Farbstoff jedoch schon im Farbbad in molekularer Form vor, so ist eine Aufnahme ins Zellinnere auch bei Gegenwart von Salzen ohne weiteres möglich.

Eine derartige nachträgliche Farbstoffaufnahme, die ich schon an speicherstoffreichen Desmidiaceen häufig beobachtet hatte (Hirn 1953), trat auch bei den meisten der von mir untersuchten Diatomeen in Erscheinung.

Besonders schön war dieser Vorgang bei *Pinnularia viridis* zu verfolgen. Infolge des hohen Grenzwerts in cH-gestuften Toluidinblaulösungen sind die p_H-Stufen, in denen primär nur Zellwandfärbung auftritt, im neutralen Bereich gelegen. Bevor ich auf die nachträgliche Farbstoffaufnahme von *P. viridis* näher eingehe, möchte ich kurz eine Beschreibung der Inhaltsfärbung dieser Diatomee geben.

Das Färbebild von *P. viridis* in Brillantkresylblau- und alkalischen Toluidinblaulösungen ist recht abwechslungsreich. Meist treten in den Vakuolen blauviolette Kügelchen auf, die sich in lebhafter BMB befinden, daneben ist eine Diffusfärbung des Zellsafts verhältnismäßig häufig. Mit der Inhaltsfärbung ist immer eine starke Vakuolenkontraktion verbunden. Manchmal erscheint die Vakuole ganz dicht mit winzig kleinen Farbkörnchen gesäumt (Abb. 5), auch größere blauviolette Tröpfchen sitzen oft dem Tonoplasten von außen her auf. Ab und zu kann sich eines dieser

Tröpfchen losreißen und befindet sich dann in lebhafter BMB im Raum zwischen Tonoplasten und Zellwand. Die blauen Tröpfchen machen durchwegs den Eindruck von Entmischungskugeln, in den

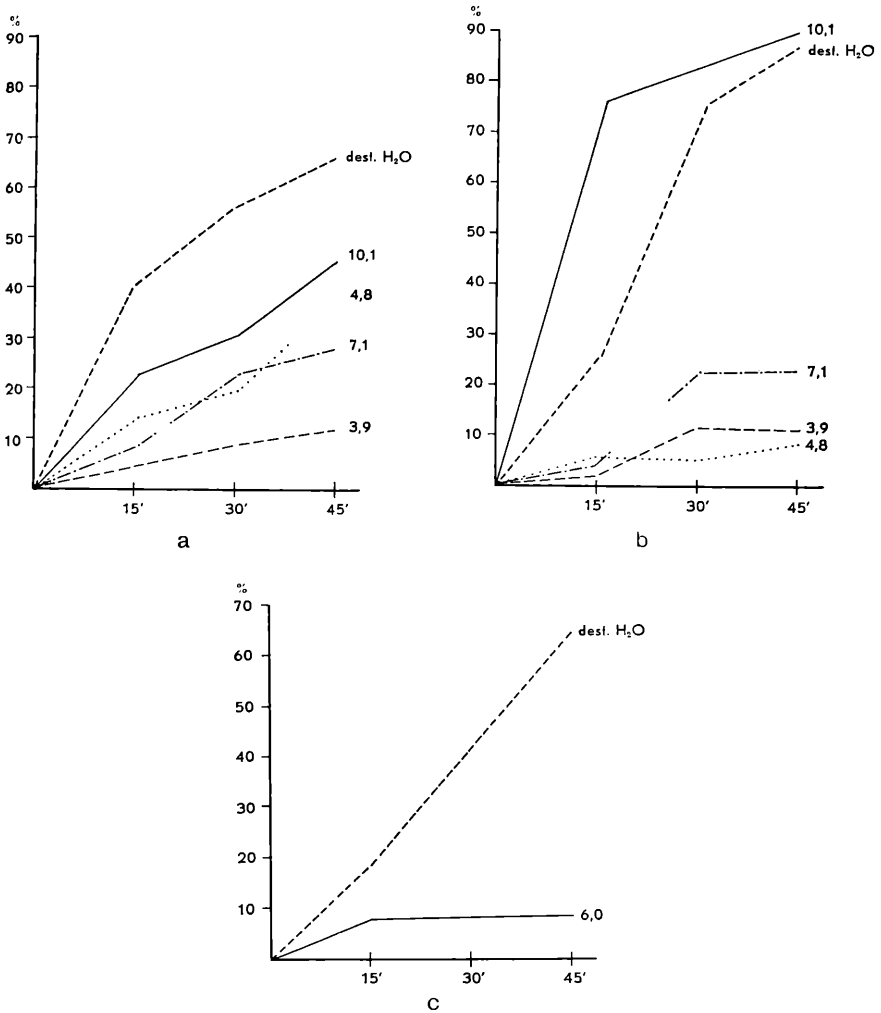

Abb. 6. Nachträgliches Eindringen des Farbstoffs (Toluidinblau) bei *Pinnularia viridis*.

a = gefärbt mit Toluidinblau p_H 4,8; b = gefärbt mit Toluidinblau in dest. H_2O; c = gefärbt mit Toluidinblau p_H 6.0.

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

ungefärbten Zellen wurden keine entsprechenden Inhaltskörper beobachtet.

Pinnularia viridis fiel schon in den cH-gestuften Reihenversuchen durch ihre bei Kurzfärbung von 2 Minuten äußerst hoch gelegene Färbeschwelle sowie durch die Abhängigkeit dieses Grenzwerts von der Färbedauer auf. Um nun zu überprüfen, wieweit eine nachträgliche Aufnahme des Farbstoffs aus der Zellwand stattfindet, wurde *P. viridis* in parallel laufenden Versuchsreihen mit gepufferten Toluidinblaulösungen vom p_H 4,8 sowie mit in reinem destilliertem Wasser hergestellten Lösungen 2 Minuten lang gefärbt und dann in Pufferlösungen von verschiedenem p_H sowie in dest. H_2O längere Zeit beobachtet (vgl. Tab. 3 a und b sowie Abb. 6, Diagr. a—c).

Tabelle 3.

Nachträgliches Eindringen des Farbstoffs bei *Pinnularia viridis*, gemessen am Prozentsatz der jeweils gefärbten Zellen.

a) gefärbt mit Toluidinblau p_H 4,8, 1 10.000.

	sofort	15 Min.	30 Min.	45 Min.
p_H 3,9	0	5	9	12
p_H 4,8	0	13	21	39
dest. H_2O	0	39	55	67
p_H 7,1	0	8	21	30
p_H 10,1	0	22	30	45

b) gefärbt mit Toluidinblau in dest. H_2O, 1 10.000.

	sofort	15 Min.	30 Min.	45 Min.
p_H 3,9	0	2	11	11
p_H 4,8	0	5	5	8
dest. H_2O	0	25	73	88
p_H 7,1	0	3	22	23
p_H 10,1	0	74	82	90

c) gefärbt mit Toluidinblau p_H 6,0, 1 10.000.

	sofort	15 Min.	30 Min.	45 Min.
p_H 6,0	0	8	8	8
dest. H_2O	0	18	42	64

In den schwach sauren Farbbädern werden zunächst nur die Zellwände elektroadsorptiv gefärbt. Erst nach einiger Zeit tritt eine Umwandlung der an die Membran gebundenen Farbionen in Farb(salz)moleküle ein, die nun durchs Plasmalemma ins Zellinnere

eindringen können. Dieser Übergang vom Farbion in das permeierfähige Molekül tritt um so rascher ein, je alkalischer die nach der Färbung zugesetzte Außenlösung ist.

Auffallend ist die starke Färbungszunahme beim Zusatz von dest. H_2O, sie ist wesentlich größer, als es dem p_H des dest. H_2O entsprechen würde. Frische Proben wurden mit einer Farblösung vom p_H 6,0 2 Minuten lang gefärbt und danach sowohl in Pufferlösung vom gleichen p_H sowie in dest. H_2O übertragen (Tab. 3 c). Während von den in Pufferlösung beobachteten Zellen nur eine ganz geringe Anzahl nach 45 Minuten Inhaltsfärbung zeigte, waren 64% der in dest. H_2O übertragenen Zellen nach der gleichen Zeit vitalgefärbt. Die Färbungszunahme in dest. H_2O geht oft sogar rascher und besser vonstatten als in ganz alkalischen Pufferlösungen. Mein Befund, der in den Kurven deutlich zum Ausdruck kommt, weist wohl darauf hin, daß die Blockierung durch die Salze der Pufferlösung (trotz Verdünnung auf n/150) eine wesentliche Rolle spielt.

Zusammenfassend kann also gesagt werden, daß bei *P. viridis* und vielen anderen Diatomeen eine nachträgliche Farbstoffaufnahme aus der Zellwand stattfindet. Wie an *P. viridis* gezeigt wurde, ist diese nachträgliche Farbspeicherung gesetzmäßig vom p_H der Außenlösung sowie von der seit der Färbung vergangenen Zeit abhängig.

III. Volutinentmischung und -färbung.

(Versuche an *Cymbella aspera*.)

Cymbella aspera zeichnet sich durch recht interessante Metachromasie- und Entmischungserscheinungen der Volutinkugeln aus. In den mit Toluidinblau anfangs violett gefärbten Volutinkugeln entstehen nach einiger Zeit Entmischungstropfen von blauer oder schwarzvioletter Farbe. Auch bei den Volutinkugeln selbst ist häufig ein Farbwechsel von violett nach blau zu beobachten.

Um das Zustandekommen der Entmischungserscheinungen und der Metachromasie zu überprüfen, wurde vor allem die zeitliche Veränderung der Färbebilder in verschiedenen p_H-Bereichen verfolgt (vgl. Tab. 4). Die Farbkonzentration betrug für diese Versuche 1 20.000, die Färbedauer 5 Minuten, dann wurde gleichnamige Pufferlösung durchgesaugt.

p_H 7.1: Sofort nach der Färbung sind alle Zellen ohne Inhaltsfärbung, nach 10—20 Minuten nehmen die Volutinkugeln einen zartvioletten Farbton an. Nur in wenigen Zellen treten außerdem in der Vakuole kleine violette Fällungskörnchen auf. Entmischungserscheinungen der Volutinkugeln waren

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

äußerst selten zu beobachten, sie bildeten sich nur bei solchen Zellen, in denen kleine Fällungskörnchen im Zellsaft vorhanden waren. Die Präparate wurden jeweils längere Zeit hindurch beobachtet, der Farbton der Volutinkugeln blieb immer violett.

p_H 8,0: Die Volutinkugeln färben sich violett, 50—80% der Cymbellen bilden außerdem kleine Fällungskörnchen im Zellsaft aus. Nach 10 bis 15 Minuten treten bereits die ersten Entmischungserscheinungen ein.

p_H 10,1 und 12 (2+8): Hier sind neben der Färbung der Volutinkugeln in allen Zellen reichlich kleine violette Fällungskörnchen enthalten. Die Entmischung der Volutinkugeln schreitet sehr rasch fort, nach 10 Minuten ist sie bereits in allen Zellen zu beobachten. Allmählich findet eine Änderung des Farbtons der Volutinkugeln von violett nach blau statt. Abb. 7 zeigt eine Zelle von *Cymbella aspera* 1½ Stunden nach der Färbung; die violetten Volutinkugeln tragen in sich wieder blaue Entmischungskugeln. Häufiger allerdings sieht man auf den hellblauen, ausgeblaßten Volutinkugeln fast schwarze Entmischungstropfen kappenartig aufsitzen. Bringt man die Zellen durch leichten Druck zum Platzen, so geschieht es häufig, daß mehrere Volutinkugeln verschmelzen.

Aus diesen Versuchen geht deutlich hervor, daß das Auftreten von Entmischungserscheinungen bei den Volutinkugeln von *Cymbella aspera* von der cH der Farblösung abhängig ist. Je alkalischer die Reaktion der Lösung, desto häufiger werden Entmischungskugeln ausgebildet. Der Farbton der Volutinkugeln ändert sich mit der seit der Färbung vergangenen Zeit. Dieser Farbwechsel von violett nach blau ist vielleicht auf eine durch zunehmende Entmischung bedingte chemische Änderung der Volutinkugeln zurückzuführen.

Tabelle 4.

Cymbella aspera, gefärbt mit Toluidinblau 1 20.000.

Volutinentmischung.

Zeit	p_H 7,1	p_H 8,0	p_H 10,1	um p_H 12
5 Minuten		— v	— v	+ v
15 Minuten	— v	+ v	+ v	+
30 Minuten	— v	+ v	+ v	+ v
1 Stunde	— v			+ b
2 Stunden	— v		+ b	+ b

\+ mit Entmischung. v Volutinkugeln violett
— ohne Entmischung. b Volutinkugeln blau

IV. Schädigende Vitalfarbstoffe.

Hochresistente Arten.

Schon bei meinen Versuchen mit dem relativ unschädlichen Vitalfarbstoff Toluidinblau waren mir Resistenzunterschiede der

geprüften Diatomeen aufgefallen. Für eine nähere Untersuchung dieser Unterschiede erwies sich Toluidinblau wegen seiner geringen Giftigkeit jedoch als ungeeignet, und so wählte ich für die folgenden Versuchsreihen solche Farbstoffe, für die Drawert 1940 Plasma- und Plastidenfärbung angibt; es sind dies unter anderen Malachitgrün, Kristallviolett, Methylviolett, Dahlia, Janusgrün und Gentianaviolett. Erst kürzlich hat W. Loub ähnliche Untersuchungen an Desmidiaceen und Chlorophyceen, hauptsächlich aus der Gruppe der *Protococcales*, durchgeführt. Er beobachtete in vielen Fällen eine Parallelität zwischen Resistenz und Nichtfärbbarkeit und weist vor allem auf die Artgebundenheit der Resistenz hin. Es sind dies alles Befunde, die sich auch bei meinen Arbeiten an Diatomeen bestätigen sollten.

Die zu Beginn eines jeden Kapitels wiedergegebene kurze Charakterisierung des Farbstoffs entnahm ich der Arbeit von Drawert 1940: „Die Aufnahme basischer Farbstoffe und das Permeabilitätsproblem."

Malachitgrün.

Triphenylmethanfarbstoff.
Farbton: bei allen p_H-Werten blaugrün.
Wanderung: p_H 2—6 zur Kathode, p_H 7—11,5 keine eindeutige Wanderung mehr, Tendenz zur Anode.
Löslichkeit in Toluol: p_H 2—11,5 unlöslich.
Vitalfärbung: Allium cepa, p_H 3—10,5 O. E. Cytoplasma- und Kernfärbung, U. E. Vakuolenfärbung.

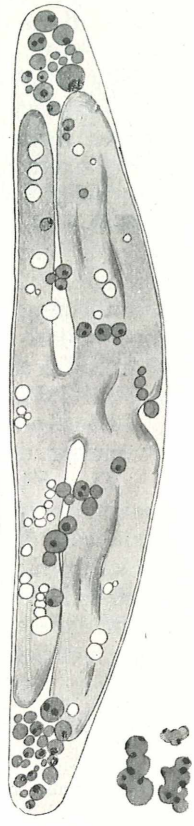

Abb. 7. *Cymbella aspera*, gefärbt mit Toluidinblau 1 : 600.000, p_H um 12. Violette Volutinkugeln mit blauen Entmischungskugeln.

Abb. 7a. Volutinkugeln verschmelzen beim Platzen der Zellen.

Abb. 7 Abb. 7a

Malachitgrün erwies sich als besonders geeignet für Färbungsversuche, da es die Zellwände nur wenig tingiert und daher einen guten Überblick über die Färbungsverhältnisse des Zellinnern zuläßt.

In den normal verwendeten Farblösungen mit einer Konzentration 1 10.000 zeigen *Amphora ovalis, Diploneis ovalis, Navicula oblonga, Pinnularia viridis* und *P. nobilis* keine Inhaltsfär-

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

bung, während *Cymbella aspera, Stauroneis acuta, Gyrosigma acuminatum, Navicula cuspidata, Neidium affine, Nitzschia linearis* und *N. sigmoidea* durchwegs eine Grünfärbung des Cytoplasmas und der Chloroplasten sowie eine mehr minder starke Kernfärbung aufweisen. Diese Zellen sind sehr stark geschädigt oder abgestorben und mit 0,3 TRBZ nicht mehr zu plasmolysieren. *Amphora ovalis* und die anderen ungefärbten Arten dagegen waren im gleichen Präparat gut plasmolysierbar. Eine Abhängigkeit der Färbung von der H-Ionenkonzentration konnte nicht beobachtet werden. *Amphora, Diploneis, Navicula oblonga* und die beiden Pinnularien erscheinen nicht nur bei p_H 4,8, sondern auch bei einer alkalischen Reaktion der Lösung, bei p_H 10,1, ungefärbt (vgl. Tab. 5).

Die Anwendung einer verdünnten Lösung von 1 50.000 ergab bei einer Färbezeit von 15 Minuten das gleiche Bild, bei einer Kurzfärbung von 5 Minuten fiel *Cymbella aspera* auf: sie war ungefärbt und hatte gesunde, fein H-förmig ausgezogene Chromatophoren. *C aspera* hat demnach gegen Malachitgrün sowie gegen Kristallviolett (Tab. 5) eine etwas höhere Resistenz.

Die Konzentration 1 100.000 wurde in die Tabelle nicht aufgenommen, da sie keine deutlich sichtbare Tinktion mehr hervorruft.

Eine Färbung von *Amphora ovalis* gelang nur mit sehr stark konzentrierten Lösungen (1 : 1000) bei längerer Einwirkungszeit des Farbstoffs. Nach 10—20 Minuten färbten sich die Volutinkugeln dunkelgrün an, auch die Chromatophoren wurden allmählich grün. Nach 30 Minuten zeigten viele Zellen auch eine zarte Plasmafärbung. Plasmolyse war bei *Amphora ovalis* in gefärbtem Zustand nicht mehr möglich.

Kristallviolett.

Triphenylmethanfarbstoff.

Farbton: p_H 2—3 blauviolett, p_H 3—10,5 violett.

Wanderung: p_H 2—6 zur Kathode, p_H 7—11.5 keine eindeutige Wanderung mehr, bei p_H 11,5 Tendenz zur Anode.

Löslichkeit in Toluol: p_H 2—11,5 unlöslich.

Löslichkeit in Chloroform: p_H 2—7 der größere Teil, p_H 8,5—10 quantitativ löslich, p_H 11.5 beide Phasen farblos.

Vitalfärbung: Allium cepa, p_H 3—10.5 O. E. Membranen, Cytoplasma, Kerne, U. E. Membranen, Vakuolen gefärbt.

Als resistent erwiesen sich *Amphora ovalis, Navicula oblonga, Diploneis ovalis, Pinnularia viridis* und *P. nobilis*, sie zeichnen sich auch bei Behandlung mit diesem Farbstoff durch fehlende Inhaltsfärbung aus. Bei *Stauroneis acuta, Gyrosigma acuminatum, Navicula cuspidata, Neidium affine, Nitzschia linearis, N. acicularis* und *N. sigmoidea* färben sich Kern und Cytoplasma blauviolett.

die Chromatophoren nehmen einen schmutzig olivgrünen Farbton an und verquellen. Diese Arten werden durch das Kristallviolett rasch getötet.

Neben schwach sauren Farblösungen wurden auch solche von alkalischer Reaktion verwendet, die sicher permeierfähige Moleküle enthalten, so daß zu starke Dissoziation des Farbstoffs nicht der Grund für die mangelnde Färbbarkeit der anfangs erwähnten Arten sein kann. *Amphora ovalis* fällt besonders im Übersichtsbild auf, da nicht nur das Zellinnere, sondern auch die Membran ungefärbt bleibt. Daß diese Arten die Einwirkung des Farbstoffs ohne Schädigung vertragen haben, beweisen einige Zellen von *Amphora* und *Pinnularia,* die ihre Bewegung nicht einstellen bzw. sie eine halbe Stunde nach dem Farbbad wieder aufnehmen und lebhaft zu kriechen beginnen. Einen besseren Beweis für den guten Gesundheitszustand der Zellen gibt es bei den Diatomeen wohl nicht.

Eine Zwischenstellung nimmt auch hier *Cymbella aspera* ein. Bei einer Farbkonzentration von 1 10.000 färben sich neben Cytoplasma, Kern und Plastiden auch die bei *Cymbella aspera* reichlich vorhandenen Volutinkugeln. Bei geringerer Konzentration des Farbbads bleibt *Cymbella aspera* gesund und ohne Schädigung.

Tabelle 5.

	Malachitgrün			Kristallviolett	
	1 : 1000	1 : 10.000	1 : 50.000	1 : 10.000	1 : 100.000
pH um.	dest. H_2O	10,1	10,1	10,1	10,1
Zeit	20 Min.	5 Min.	5 Min.	5 Min.	5 Min.
Amphora ovalis	+	—	—	—	—
Diploneis ovalis	+	—	—	—	—
Navicula oblonga	+	—	—	—	—
Pinnularia viridis	+	—	—	—	—
Pinnularia nobilis	+	—	—	—	—
Cymbella aspera	+		—	+	—
Gyrosigma acuminatum	+	+	+	+	+
Navicula cuspidata	+	+	+	+	+
Neidium affine	+		+	+	+
Nitzschia linearis	+		+	+	+
Nitzschia acicularis				+	
Nitzschia sigmoidea	+	+	+	+	+
Stauroneis acuta	+	+	+		

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

Dahlia.

Triphenylmethanfarbstoff.
Farbton: p_H 2—9 blauviolett, p_H 3—10,5 rotviolett.
Wanderung: p_H 2—7 eindeutig zur Kathode, p_H 8—11,5 keine Wanderung mehr.
Löslichkeit in Toluol: schwer entscheidbar, da der Farbstoff sofort farblos wird.
Löslichkeit in Chloroform: p_H 2—7 etwas, p_H 8,5—10,5 quantitativ löslich.
Vitalfärbung: Allium cepa, p_H 5—10,5 O. E. Membranen und Kerne, U. E. Membranen und Vakuolen gefärbt.

Die Färbeversuche mit Dahlia zeigten wieder die erhöhte Resistenz der bereits hervorgehobenen Arten. Die Versuchsergebnisse sind aus Tabelle 6 zu entnehmen.

Wenn nun *Amphora ovalis* wirklich widerstandsfähiger gegen das Farbbad ist als *Cymbella* und die meisten anderen geprüften Arten, so müssen auch plasmolysierte Zellen ihre Plasmolyse bei Zusatz des Farbstoffs unverändert beibehalten; für färbbare, der Gifteinwirkung des Farbstoffs voll ausgesetzte Arten ist jedoch ein Absterben der Protoplasten zu erwarten. Frisches Material wurde mit 0,3 TRBZ plasmolysiert und dann erst Dahlia 1 10.000, p_H 10,1 + 0,3 TRBZ zugesetzt und 5 Minuten einwirken gelassen. Tatsächlich blieb *Amphora* unverändert schön plasmolysiert. Die vorher gut gerundeten Protoplasten von *Cymbella aspera* waren jedoch abgestorben, die Chromatophoren verquollen und teilweise in Stücke zerfallen, das Cytoplasma körnig violett gefärbt.

Janusgrün und Gentianaviolett.

Janusgrün.

Azofarbstoff.
Farbton: bei allen p_H-Werten blaugrün.
Wanderung: p_H 2—11,5 zur Kathode.
Löslichkeit in Chloroform: p_H 2—8,5 im Verhältnis 1:1, p_H 9,5—11 der größere Teil, p_H 11,5 quantitativ löslich.
Vitalfärbung bei Allium cepa: p_H 3—9 reine Membranfärbung, p_H 10 bis 11,5 O. E. farblos, U. E. Vakuolenfärbung.

Gentianaviolett.

Triphenylmethanfarbstoff.
Farbton: p_H 3—11,5 rotviolett.
Wanderung: p_H 2—8 zur Kathode, p_H 9—11,5 keine eindeutige Wanderung.
Löslichkeit in Toluol: p_H 2—7 gar nicht, p_H 8,5—9,5 etwas, p_H 11,5 fast quantitativ löslich.
Löslichkeit in Chloroform: p_H 2—7 der größere Teil, p_H 8,5—11,5 quantitativ löslich.
Vitalfärbung: Allium cepa, p_H 3—10 O. E. Membran, Cytoplasma und Kerne gefärbt, U. E. Membranen und Vakuolen gefärbt.

Auch mit diesen beiden stark giftigen Plasmafarbstoffen blieb das Zellinnere von *Amphora ovalis, Diploneis ovalis, Navicula oblonga, Pinnularia viridis* und *P. nobilis* ungefärbt. 1 Stunde nach der Färbung mit Janusgrün waren diese Arten noch mit 0,3 TRBZ plasmolysierbar. Alle anderen in Tabelle 6 angeführten Arten zeigten Färbung von Kern und Cytoplasma sowie Verfärbung und Verquellen der Chromatophoren. Diese Zellen waren stark geschädigt und starben schnell ab.

Methylviolett und Bismarckbraun.

Methylviolett.

Triphenylmethanfarbstoff.

Farbton: p_H 3—11,5 violett.

Wanderung: p_H 2—8 zur Kathode, p_H 9—11,5 keine Wanderung.

Löslichkeit in Toluol: p_H 2—7 gar nicht. p_H 8,5 etwas löslich. p_H 9 bis 11,5 beide Phasen farblos.

Löslichkeit in Chloroform: p_H 2 der größere Teil, p_H 3—11,5 quantitativ löslich.

Vitalfärbung: Allium cepa, p_H 5—11,5 O. E. Cytoplasma- und Kernfärbung, U. E. Vakuolenfärbung.

Bismarckbraun.

Azofarbstoff.

Farbton: p_H 2—6 rotbraun, p_H 6,5—11,5 gelb.

Wanderung: p_H 2—6 zur Kathode, p_H 6,5—11,5 keine Wanderung mehr.

Löslichkeit in Toluol: p_H 3 fast quantitativ, p_H 5—11,5 quantitativ löslich.

Löslichkeit in Chloroform: p_H 3—11,5 quantitativ löslich.

Vitalfärbung: Allium cepa, p_H 3—5 Membranfärbung, in der U. E. auch Vakuolen gefärbt, p_H 7—11,5 O. E. Cytoplasma- und Kernfärbung, U. E. Vakuolenfärbung.

Das Ergebnis der konzentrationsgestuften Versuche mit Methylviolett entspricht vollkommen den mit anderen Farbstoffen gewonnenen Resultaten; wieder zeichnen sich bestimmte Arten durch mangelnde Inhaltsfärbung aus. Besonders bemerkenswert ist die fast unglaubliche Resistenz von *Amphora ovalis* und *Diploneis ovalis,* die nach einem einstündigen Farbbad 1 : 1000 noch immer ungefärbt waren und durch ihr gesundes Aussehen lebhaft von den anderen durchwegs stark überfärbten und zum Großteil bereits abgestorbenen Diatomeen des Präparats abstachen (vgl. Tab. 6).

In einer zweiten Versuchsreihe wurde das Plasmolyseverhalten und damit der Grad der Schädigung für einige Arten vergleichsweise bei Färbung mit Methylviolett und Bismarckbraun geprüft. Die Zellen wurden sowohl zuerst gefärbt und dann erst in eine 0,3-TRBZ-Lösung übertragen als auch vorplasmolysiert und nach-

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

träglich gefärbt. Außerdem wurde ein Teil der Zellen mit einer Farblösung behandelt, der bereits TRBZ beigefügt war, so daß Farbstoff und Plasmolytikum gleichzeitig einwirken konnten (vgl. Tab. 7 a und b).

Tabelle 6.

	Methylviolett			Janusgrün	Dahlia	Gentianaviolett
	1 : 1000	1 : 10.000	1 : 100.000	1 : 10.000	1 : 10.000	1 : 10.000
pH um . .	dest. H_2O	10,1	10,1	10,1	10,1	10,1
Zeit .	60 Min.	5 Min.	5 Min.	30 Min.	5 Min.	5 Min.
Amphora ovalis	—!	—	—	—	—	—
Diploneis ovalis	—!	—	—		—	—
Navicula oblonga	+	+ —	—	—	—	—
Pinnularia viridis	+	—	—	—	—	
P. nobilis	+	—	—	—	—	—
Cymbella aspera	+	+	+	+	+	+
Gyrosigma acuminatum	+	+	+	+	+	+
Navicula cuspidata	+	+	+	+	+	+
Neidium affine	+	+	+	+	+	+
Nitzschia linearis	+	+	+	+	+	+
N. acicularis	+	+	+	+	+	+
N. sigmoidea	+	+	+	+	+	+
Stauroneis acuta	+	+	+			

Tabelle 7 a und b.

Färbung und Plasmolysierbarkeit mit Methylviolett und Bismarckbraun.

a) Methylviolett

	1 : 10.000 (0,3 TRBZ) 5 Min.		1 : 10.000 dann 0,3 TRBZ		0,3 TRBZ dann 1 : 10.000	
Amphora ovalis	—	O	—	O	—	O
Navicula oblonga	+ —	O —	+ —	O —	+ —	O —
Pinnularia viridis	—	O	—	O	—	O
Cymbella aspera .	+	—	+	—	+	—
Nitzschia linearis	+	—	+	—	+	—
Stauroneis acuta	+	O	+	—	+ —	O

b) Bismarckbraun

	1:10.000 in 0,3 TRBZ, gelöst in Standortswasser					1:10.000 dann 0,3 TRBZ	0,3 TRBZ dann 1:10.000
	5 Min.	1 Std.	2 Std.	4 Std.	6 Std.		
Amphora ovalis .	+ O	+ O	+ O	+ O	+ O	+ O	+ O
Navicula oblonga .	+ O	+ O	+ O	— —	— —	+ O	+ O
Pinnularia viridis	+ O	+ O	+ O	+ — O —	+ — O —	+ O	+ O
Cymbella aspera .	+ O	+ O	+ O	— —	— —	+ O	+ O
Nitzschia linearis .	+ O	+ O		— —	— —	+ O	+ O

+ = Inhaltsfärbung
O = Plasmolyse

Amphora ovalis und *Pinnularia viridis*, die mit Methylviolett so wie bei allen vorhergehenden Untersuchungen keine Inhaltsfärbung zeigten, waren gut plasmolysierbar, *Cymbella aspera* und *Nitzschia linearis* waren gefärbt und abgestorben. *Navicula oblonga*, die mit den anderen Plasmafarbstoffen meist ungefärbt blieb, zeigt mit Methylviolett zarte Färbung von Kern und Plasma und ist in diesem Zustand beginnender Inhaltsfärbung oft noch plasmolysierbar. Wurden die Zellen vorplasmolysiert und dann erst Farblösung zugesetzt, so blieben *Amphora ovalis, Pinnularia viridis* und teilweise auch *Navicula oblonga* ungefärbt und in plasmolysiertem Zustand, *Cymbella aspera* und *Nitzschia linearis* speicherten das Methylviolett und starben ab. Nur selten behielt *C. aspera* auch nach Anfärbung des Plasmas noch schön gerundete Protoplasten.

Als recht resistent erwiesen sich vorplasmolysierte Zellen von *Stauroneis acuta*, die erst $^1/_2$—2 Stunden nach dem Eintreten der Inhaltsfärbung abzusterben begannen. Auch bei Färbung mit einer TRBZ-haltigen Methylviolettlösung blieben die Zellen mehrere Stunden lang am Leben, obwohl das Cytoplasma violett tingiert war. Dies ist wohl darauf zurückzuführen, daß die Plasmolyse v o r der Färbung des Protoplasmas beginnt; es handelt sich also auch hier eigentlich um eine Anfärbung vorplasmolysierter Protoplasten.

Stauroneis acuta zeigte einen interessanten Nekroseverlauf, der hier kurz geschildert werden soll. Das Absterben der plasmolysierten Zellen beginnt mit einer starken Quellung und gleichzeitig intensiveren Anfärbung des Protoplasmas. Es bilden sich dicke Kappen, der ursprünglich einheitliche Zellsaftraum zerfällt in Teilvakuolen, die nach außen drängen und schließlich den

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

ganzen Raum zwischen Chromatophor und Zellwand erfüllen. Dieses Tonoplastenstadium kann 10—15 Minuten erhalten bleiben, dann sterben auch diese letzten lebenden Plasmateile ab, und die Zelle ist nur mehr vom verquollenen Chromatophor und von diffuskörnig gefärbtem totem Protoplasma erfüllt.

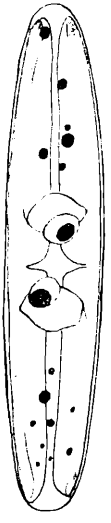

Abb. 8. *Navicula oblonga*, gefärbt mit Bismarckbraun 1 : 10.000 in Standortswasser. Volutinkugeln und Entmischungskugeln orangebraun.

Die gleiche Versuchsanordnung wie für Methylviolett wurde mit dem unschädlichen, im neutralen Bereich hauptsächlich in molekularer Form vorliegenden Farbstoff Bismarckbraun durchgeführt. Hier ist die Inhaltsfärbung ganz anderer Art: es tritt keine Diffusfärbung von Cytoplasma, Plastiden oder Kern ein, sondern der Farbstoff wird in den Volutinkugeln oder in Form von Entmischungskörnchen festgelegt und dadurch weitgehend unschädlich gemacht. Nach Cholnoky 1935 und 1937 werden dem Protoplasma auf diese Art viel weniger lebenswichtige Stoffe entzogen, als dies bei diffuser Plasmafärbung der Fall ist.

Mit Bismarckbraun färben sich auch *Amphora ovalis, Diploneis ovalis, Navicula oblonga* (Abb. 8) und *Pinnularia viridis* wenige Minuten nach Zusatz der Farblösung an. Die Zellen sind bei allen Arten, selbst bei den weniger resistenten, nach der Färbung noch in gutem Zustand und tadellos plasmolysierbar. Plasmolyse und Inhaltsfärbung schließen einander also bei Färbung mit Bismarckbraun nicht aus, wie dies in den meisten Fällen mit Methylviolett der Fall ist. Erst nach 3—4 Stunden beginnen die empfindlicheren Arten abzusterben, *Amphora ovalis* fällt jedoch auch hier wieder durch erhöhte Resistenz auf (vgl. Tab. 7 b).

Ergebnis.

In allen hier angeführten Versuchsreihen mit Malachitgrün, Gentianaviolett, Kristallviolett, Janusgrün, Dahlia und Methylviolett zeigten sich bemerkenswerte Resistenzunterschiede der geprüften Diatomeen. *Amphora ovalis, Diploneis ovalis, Pinnularia viridis* und *P. nobilis* sowie *Navicula oblonga* fielen nach der Einwirkung der Farbstoffe durch ihr ungefärbtes, gesundes Aussehen

auf, während bei *Stauroneis acuta, Gyrosigma acuminatum, Navicula cuspidata, Neidium affine, Nitzschia linearis* und *N. sigmoidea* Protoplasma, Zellkern und Plastiden diffus gefärbt und die Zellen stark geschädigt waren.

Diese Farbstoffresistenz ist vielleicht mit Höflers Befunden über die Sodaresistenz verschiedener Desmidiaceen vergleichbar. Höfler 1951 wies für die Zieralgen eine erhöhte Widerstandskraft gegen Soda- und Kaliumoxalatlösungen nach, die auf die abschirmende Wirkung eines besonders resistenten Plasmalemmas zurückzuführen ist. Es erscheint möglich und bleibt zu prüfen, ob auch die hier untersuchten resistenten Diatomeen eine besonders widerstandsfähige äußere Plasmagrenzschicht besitzen, die dem (ionisierten) Farbstoff lange Zeit den Zutritt ins Zellinnere verwehrt.

Zusammenfassung.

1. Die Speicherkraft der Diatomeen in cH-gestuften Farbbadreihen ist ganz bedeutend. Bei Verwendung von Toluidinblau, einem basischen Farbstoff, dessen Umschlagsbereich hoch in der cH-Skala liegt, färben sich die meisten Diatomeen auch in fast zur Gänze ionisierten, molekülarmen Lösungen von p_H 6,0 noch an. Eine Ausnahme bildet *Pinnularia viridis,* deren Grenzwert bei Kurzfärbung bei p_H 10,1 liegt. Der Farbstoff wird häufig in Form von Entmischungströpfchen gespeichert; bei Arten, die vorgebildete Volutinkugeln besitzen, färben sich meist diese an.

2. Die außergewöhnliche Speicherkraft der Diatomeen befähigt sie zu einer nachträglichen Aufnahme des Farbstoffs aus der Zellwand ins Zellinnere. Auch wo der Farbstoff zuerst an der Zellwand nur elektroadsorptiv gespeichert wird, tritt er nachher in einer offenbar permeierfähigen Form in die Zelle ein. Diese nachträgliche Inhaltsfärbung steigt, wie an *Pinnularia viridis* gezeigt wurde, mit dem p_H der Außenlösung und der seit der Färbung vergangenen Zeit.

3. Entmischungserscheinungen können nicht nur im Zellsaft und im Plasma, sondern auch in den Volutinkugeln verschiedener Diatomeen auftreten. Bei *Cymbella aspera* ist die Volutinentmischung abhängig vom Dissoziationsgrad der Farblösung; je alkalischer, d. h. molekülreicher, die Farblösung ist, desto häufiger treten Entmischungserscheinungen auf.

4. Mit den Plasmafarbstoffen Malachitgrün, Kristallviolett, Gentianaviolett, Janusgrün, Dahlia und Methylviolett werden die meisten Diatomeen durch Diffusfärbung von Plasma, Kern und Plastiden getötet. Einige Arten, wie *Amphora ovalis, Diploneis*

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

ovalis, Navicula oblonga, Pinnularia viridis und *P. nobilis,* zeigen jedoch eine weit höhere Resistenz gegen diese Farbstoffe, es trat keine Anfärbung und Schädigung des Zellinnern ein.

Literaturverzeichnis.

Babes, V., 1889, Über isoliert färbbare Anteile von Bakterien. Zschr. f. Hygiene, Bd. 5, 173.

— 1895, Beobachtungen über die metachromatischen Körperchen, Sporenbildung, Verzweigung, Kolben- und Kapselbildung pathogener Bakterien. Zschr. f. Hygiene 20, 412.

Bütschli, O., 1890, Über den Bau der Bakterien und verwandter Organismen. Leipzig 1890.

— 1896, Weitere Ausführungen über den Bau der Cyanophyceen und Bakterien. Leipzig 1896.

Cholnoky, B. v., 1934, Plasmolyse und Lebendfärbung von Melosira. Protoplasma 22, 161.

— 1935, Farbstoffaufnahme und -speicherung lebender pennater Diatomeen. ÖBZ 84, 93.

— 1937, Protoplasmatische Untersuchungen durch Lebendfärbung und Plasmolyse. Math. u. naturw. Anzeiger d. ung. Akad. d. Wiss., Bd. 56, 944.

Cholnoky, B. v., und Höfler, K., 1950, Vergleichende Vitalfärbungsversuche an Hochmooralgen. Sitz.-Ber. d. österr. Akad. Wiss., math.-naturw. Kl., I. Abt., 199.

Czaja, A. Th., 1936, Untersuchungen über den Membraneffekt der Adsorptionsgewebe und über die Farbstoffaufnahme in die lebende pflanzliche Zelle. Planta 26, 90.

Dangeard, P. A., 1916, Note sur les corpuscules metachromatiques des Levures, Bull. Soc. Mycol. Fr. 32, 27.

Dangeard, P., Cytologie végétale et cytologie générale. Paris 1947.

Drawert, H., 1940, Zur Frage der Stoffaufnahme durch die lebende pflanzliche Zelle II, Die Aufnahme basischer Farbstoffe und das Permeabilitätsproblem. Flora 34, 159.

— 1948, Desgl. V, Zur Theorie der Aufnahme basischer Farbstoffe, Zschr. f. Naturforschung 3b, 111.

— 1951, Beiträge zur Vitalfärbung pflanzlicher Zellen. Protoplasma 40, 85.

Guilliermond, A., 1903, Recherches cytologiques sur les Levures. Rev. Gen. Bot. 1903, 166.

— 1930, Le vacuome des cellules végétales. Sammelreferat. Protoplasma 9, 133.

Guilliermond, A., Atkinson, L. R., The Cytoplasm of the Plant Cell. Waltham, Mass., USA. 1941.

Heinzerling, O., 1908, Der Bau der Diatomeenzelle mit beonderer Berücksichtigung der ergastischen Gebilde und der Beziehung des Baues zur Systematik. Bibliotheca botanica, Stuttgart 1908.

Hirn, I., 1953, Vitalfärbungsstudien an Desmidiaceen. Flora 140, 453.

Höfler, K., 1947, Was lehrt die Fluoreszenzmikroskopie von der Plasmapermeabilität und Stoffspeicherung? Mikroskopie 2, 13.

— 1948, Einige Nekrosen bei Färbung mit Akridinorange. Sitz.-Ber. d. österr. Akad. Wiss., math.-naturw. Kl., I. Abt., 156, 585.

— 1949a, Fluoreszenzmikroskopie und Zellphysiologie. Biologia generalis 19, 90.

Höfler, K., 1949b, Fluorochromierungsstudien an Pflanzenzellen. Beiträge zur Fluoreszenzmikroskopie. 1. Sonderb. der Zschr. Mikroskopie 46.
Höfler, K., und Schindler, H., 1951, Vitalfärbung von Algenzellen mit Toluidinblaulösungen gestufter Wasserstoffionenkonzentration. Protoplasma 40, 137.
Hustedt, F., Bacillariophyta, in: Die Süßwasserflora Mitteleuropas, Heft 10, herausgeg. von Pascher. Jena 1930.
Lauterborn, R., Untersuchungen über Bau, Kernteilung und Bewegung der Diatomeen. Leipzig 1896.
Loub, W., 1951, Über die Resistenz verschiedener Algen gegen Vitalfarbstoffe. Sitz.-Ber. d. österr. Akad. Wiss., math.-naturw. Kl., Abt. I, Bd. 160, 10. Heft, 829.
Meyer, A., 1903, Praktikum der botanischen Bakterienkunde. Jena 1903.
— 1904, Orientierende Untersuchungen über die Verbreitung, Morphologie und Chemie des Volutins. Bot. Zschr. 1904, 113.
Pecksieder, E., 1950, Zur Frage der Farbionenpermeabilität des Protoplasmas. Biologia generalis 19, 224.
Richter, O., 1909, Zur Physiologie der Diatomeen. Die Biologie der Nitzschia putrida. Denkschr. d. kais. Akad. d. Wiss. in Wien, math.-naturw. Kl., Bd. 84, 657.
Strugger, S., 1936, Beiträge zur Analyse der Vitalfärbung pflanzlicher Zellen mit Neutralrot. Protoplasma 26, 56.